# 家蝇细胞凋亡起始酶 Caspase-1 基因的克隆及在不同虫态的表达

程 功，龚 亮，陈 永，胡美英，钟国华*
（华南农业大学昆虫毒理研究室，广州 510642）

**摘要**：为了研究 Caspases 家族在昆虫发育变态中的作用，通过 RT-PCR 扩增并结合 RACE 技术，克隆得到家蝇 *Musca domestica* Caspase-1 基因 1 条，命名为 *Mdom-Caspase-1*（GenBank 中 cDNA 序列号为 EU854472，氨基酸序列号为 ACF71490）。该基因全长 1 295 bp，阅读框序列 870 bp，共编码 289 个氨基酸，理论分子量 32.83 kDa，等电点8.67。Mdom-Caspase-1 蛋白有 5 个保守的半胱氨酸位点 QACQG，具有 Caspase 的典型特征；整个分子呈现亲水性，有 8 个区域共 89 个氨基酸为亲酯性，蛋白质二级结构主要由 11 个 α 螺旋区、7 个 β-折叠区、17 个 β-转角区组成。昆虫间 Caspase-1 分子具有明显的保守性，Mdom-Caspase-1 与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 Caspase-1 氨基酸序列相似性为 65%~77%。RT-PCR 半定量分析结果表明，*Mdom-Caspase-1* 基因在家蝇各个虫态中均有表达，但在卵期、3 龄幼虫、预蛹、蛹和羽化 5 d 的雌虫中的表达量明显高于其他虫态。这些结果提示 Caspase-1 可能与昆虫发育变态关系密切，为进一步研究昆虫 Caspase-1 功能、设计 Caspase-1 抑制剂提供了分子基础。

**关键词**：家蝇；细胞凋亡；Caspase-1；*Mdom-Caspase-1*；克隆；表达量
**中图分类号**：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2009)07-0721-07

## Cloning of the apoptosis initial enzyme Caspase-1 gene from the house fly, *Musca domestica* and its expression in different developmental stages

CHENG Gong, GONG Liang, CHEN Yong, HU Mei-Ying, ZHONG Guo-Hua* (Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract**: Members of the Caspase family play a central and evolutionary role in apoptosis, which remove the unwanted, damaged and dangerous cells during development to maintain homeostasis. In this study, by using the total RNA isolated from the whole body of the house fly, *Musca domestica*, the full-length sequence of *Mdom-caspase-1* gene encoding the Caspase-1 was cloned by the methods of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification cDNA ends (RACE) to explore the function of caspase in insect growth and metamorphism. The sequence analysis showed that *Mdom-caspase-1* encodes 289 amino acid residues and the 1 295 bp full-length cDNA contains an 870 bp open reading frame (ORF). The GenBank accession numbers of cDNA and amino acid of *Mdom-caspase-1* are EU854472 and ACF71490, respectively. The deduced Mdom-caspase-1 protein (MW 32.83 kDa; pI 8.67) has 5 conserved cysteines QACQG, which is one of the typical characteristics of Caspase. The Mdom-caspase-1 protein is hydrophilic, while 8 regions containing 89 amino acids are hydrophobic. The protein secondary structure mainly consists of 11 α helices, 7 β folders and 17 turns. The phylogenetic tree was created from the alignments of the amino acid sequences, and the analysis revealed that Caspase-1 possessed distinct conservation in evolution and the amino acid sequence of Mdom-caspase-1 is 65%–77% identical to Caspase-1 from *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. The results of RT-PCR revealed that *Mdom-caspase-1* was expressed in every stage of *M. domestica*, and in five stages including the egg, 3rd instar larva, pre-pupa, pupa and the 5 d adult female the expression levels were obviously higher than those in other stages. The results suggest that the Caspase-1 gene may have some relationships with the growth and metamorphism of insects. These results would provide some valuable

资助项目：国家自然科学基金项目(30500335)；教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金项目(2004061)
作者简介：程功，女，硕士研究生，主要研究方向为天然源农药毒理学
通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 020-85280308; E-mail: guohuazhong@ scau. edu. cn
收稿日期 Received: 2009-01-04; 接受日期 Accpted: 2009-04-02

information to explore the molecular function of Caspase-1 in insects and develop the specific Caspase-1 inhibitors.

**Key words**: *Musca domestica*; apoptosis; Caspase-1; *Mdom-Caspase*-1; cloning; expression level

细胞凋亡(apoptosis)是多细胞生物在机体生长发育、细胞分化和病理状态中基因调控的细胞主动性死亡的过程和状态。半胱氨酸蛋白酶 Caspases 是启动和执行细胞凋亡的主要酶类，决定着细胞凋亡的进程及相关的生理功能。Caspase-1 是第一个被鉴定的 Caspases 家族成员，是由 Miller 等(1993)在研究白介素-1β(IL-1β)前体的蛋白酶时发现，最早被称为 IL-1β 转化酶 (interlukin-1β-converting enzyme, ICE)。目前认为 Caspase-1 具有水解蛋白和激活 IL-1 前体的功能，在细胞凋亡中起重要作用 (Martinon *et al*., 2002; Gupta *et al*., 2002; Xu *et al*., 2006; Callus and Vaux, 2007)。近年来，昆虫 Caspase-1 基因研究渐多 (Ahmad *et al*., 1997; Cohen, 1999; Kumar and Doumanis, 2000; Pei *et al*., 2002)，人们先后从草地贪夜蛾 *Spdoptera frugiperda* (Alnemri *et al*., 1994)、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*(Hebert *et al*., 2009)离体培养细胞系和家蚕 *Bombyx mori* (Pei *et al*., 2002)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Nene *et al*., 2007)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Hoskins *et al*., 2007)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Yang *et al*., 2008)等活体组织中克隆得到 Caspase-1 基因，这些结果为深入研究昆虫细胞凋亡机制提供了重要基础。本文以家蝇 *Musca domestica* 为供试昆虫，对其 Caspase-1 基因进行克隆、序列分析及 RT-PCR 半定量表达分析，旨在为深入研究 Caspase-1 在昆虫生长发育中的作用、设计 Caspase-1 诱导剂等提供分子基础。

# 1 材料和方法

## 1.1 供试昆虫及试剂

供试家蝇 *M. domestica* 为野生品系，由本实验室长期饲养供试。饲养条件：温度 25~28℃，相对湿度 60%~70%，光周期 12L:12D。幼虫人工饲料由每 1 000 g 含麦麸 500 g、面粉 25 g、奶粉 16 g、酵母粉 5 g 和适量水配制而成；成虫人工饲料为白砂糖和奶粉按 1:1 比例组成。大肠杆菌(DH5α)由本课题组保存。总 RNA 提取试剂盒为 OMEGA 公司产品，琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 TIANGEN 公司产品，Gene Racer™ Kit 试剂盒购自 Invitrogen 公司，PMD20-T 载体、AMV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司，所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

## 1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

参照 OMEGA 公司总 RNA 提取试剂盒的说明书提取供试昆虫家蝇的总 RNA，直接用于 RT-PCR 扩增或 -80℃保存。参照 TaKaRa 的 AMV 反转录酶使用说明书合成 cDNA 第一链，用于 PCR 扩增或 -20℃保存。

## 1.3 引物设计及合成

根据 Caspases 家族保守区域，设计简并引物 CaspF1 和 CaspR1，得到 Caspase-1 中间片段后，利用 RACE(rapid amplification of cDNA ends)技术扩增 5′和 3′端序列，最后依据 5′和 3′端的非编码区序列设计全长引物扩增 cDNA 全长。PCR 反应引物见表 1。

**表 1 用于扩增家蝇 Caspase-1 基因的简并引物和 RACE 特异引物**

**Table 1 The degenerate primers and specific primers for cloning Caspase-1 gene of *Musca domestica***

| 引物 Primers | 序列 Sequences (5′-3′) |
|---|---|
| 简并引物 Degenerate primers | CaspF1: CGNWCBGGYACVRATGTVGA |
| | CaspR1: GACTGSATRAACCANGANCC |
| 3′RACE 特异引物 3′RACE specific primer | Casp3′ RACE: CTTTCGCACGGAGAATTGGGC |
| 5′RACE 特异引物 1 5′RACE specific primer 1 | Casp5′ RACE1: CTCATTGATGACTCACCATCAG |
| 5′RACE 特异引物 2 5′RACE specific primer 2 | Casp5′ RACE2: GGTCCAAACGATCACCTTGAC |
| 半定量引物 RT-PCR primer | CaspBF: CTGCTACATATGCAGCAGGGTGCAATAGCCCAAT |
| | CaspBR: CCGCTCGAGTTAAACTCTTGCTGCTGGTGGTAAT |
| 内参基因特异性引物 Specific primer of reference gene | NS: CATCATCTCCGCTCCATC |
| | NX: AAGCCATACCAGTGAGTTTACC |

### 1.4　PCR 扩增和测序

以反转录的 cDNA 为模板，通过简并引物 CaspF1 和 CaspR1 组合进行 PCR 扩增得中间片段。反应程序为：94℃预变性 4 min；接着进行 35 个循环，循环条件为 94℃ 30 s，63℃ 45 s，72℃ 45 s；最后 72℃延伸 10 min，4℃保存。

3′RACE：以反转录的 cDNA 为模板，以特异性引物 Casp3′RACE 和 Oligo(dT)$_{20}$组合进行 PCR 扩增。反应程序为：94℃预变性 4 min；接着进行 35 个循环，循环条件为 94℃ 30 s，60℃ 45 s，72℃ 45 s；最后 72℃延伸 10 min，4℃保存。

5′RACE：按照 Gene Race$^{TM}$ Kit 试剂盒的步骤说明进行扩增。反应程序为：94℃预变性 2 min；接着进行 35 个循环，循环条件为 94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 2 min；最后 72℃延伸 7 min，5℃保存。上述反应结束后，用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物均经过 TIANGEN 凝胶回收试剂盒纯化回收，参照 PMD20-T 载体说明书连接到 PMD20-T 载体，然后转入大肠杆菌 DH5α，挑取白色菌落，培养后参照 Sambrook 等(1989)方法提取质粒，用 *Eco*R Ⅰ 酶切和 PCR 两种方法进行重组质粒鉴定。选择经 PCR 鉴定为阳性的菌液送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

### 1.5　序列分析

应用 NCBI 的 Blastx 程序，对家蝇 Caspase-1 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与 GenBank 公布序列进行比较分析，并通过 DNAStar 软件及网站(www.expasy.org)提供的软件进行序列分析。

### 1.6　家蝇 Caspase-1 表达的半定量分析

分别提取家蝇卵期、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、预蛹、蛹、羽化 1 d 的成虫，羽化 3 d 的雌虫和雄虫，以及羽化 5 d 的雌虫和雄虫共 11 种虫态的总 RNA，反转录后 -20℃保存，备用。选择家蝇磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为半定量分析内参基因，长 337 bp，上下游引物分别是 NS 和 NX(表 1)。调整各个样品的 PCR 产物表达亮度相同，确定各虫态扩增目的基因时的模板量。

以反转录的 cDNA 为模板，CaspBF 和 CaspBR 为上下游引物，循环数分别设定为 19，21，23，25，27，29，31，33，35 个循环，反应程序同 1.4 的中间片段扩增，对 PCR 产物进行电泳检测，最后确定到达平台期的 PCR 反应循环数 27。根据确定的反应循环数，PCR 扩增内参基因 GAPDH，调整体系加入的 cDNA 模板量，使家蝇各个虫态内参基因表达亮度相同。反应程序如下：94℃ 变性 2 min；接着 27 个循环，循环条件为 94℃ 30 s，60℃ 45 s，72℃ 1 min；最后 72℃延伸 10 min，4℃保存；1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。根据确定的反应循环数和半定量分析的模板量，以各虫态反转的 cDNA 为模板，CaspBF 和 CaspBR 为上下游引物，对 Caspase-1 基因的编码区进行 PCR 扩增，1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

## 2　结果与分析

### 2.1　编码家蝇 Caspase-1 的 cDNA 全长序列及推测的氨基酸序列

以家蝇卵期的 cDNA 为模板，以 CaspF1 和 CaspR1 为上下游引物对家蝇 Caspase-1 基因进行 PCR 扩增，回收纯化后，与 PMD20-T 载体连接，构建重组质粒，挑取转化大肠杆菌 DH5α 后的白色菌落，进行培养，PCR 鉴定得到 1 条 476 bp 的中间片段(图 1：A)。据此设计特异性引物，进行 3′RACE 扩增，得到一条 813 bp 的下游序列，并且在 3′Poly (A)前有 AATAAA 的加尾信号，表明为 3′的完整序列(图 1：B)。根据 3′RACE 获得的片段，设计特异性引物 Casp5′RACE1 和 Casp5′RACE2，进行 5′RACE 扩增，得到一条 658 bp 的上游序列(图 1：C)。在此片段中有起始密码子 ATG，并且在起始密码子前还有一段长为 159 bp 的非编码区序列，序列分析证实得到 5′端完整序列。根据得到的 3 个家蝇 Caspase-1 的 cDNA 片段，将序列中的重复区域去除，拼接得到家蝇 Caspase-1 基因 *Mdom-Caspase-1* 的完整序列。该序列全长共 1 295 bp，其中编码序列长为 870 bp，共编码 289 个氨基酸，GenBank 中 cDNA 序列号为 EU854472，氨基酸序列号为 ACF71490。

### 2.2　家蝇 Caspase-1 推测的氨基酸序列与进化树分析

在 Mdom-Caspase-1 编码的氨基酸序列中(图 2)，图标第 159～163 位是 5 个保守的氨基酸位点 QACQG，说明 Mdom-Caspase-1 具有 Caspase-1 的保守特征。预测 Mdom-Caspase-1 蛋白氨基酸序列的相对分子质量为 32.83 kDa，等电点为 8.67，整个分子呈现亲水性，有 8 个区域共 89 个氨基酸显示为亲酯性。用 Garnier-Robson 法预测 Mdom-Caspase-1 蛋白的二级结构由 11 个 α 螺旋区、7 个 β-折叠区、17 个 β-转角区组成，其他均为无规则卷曲领域。

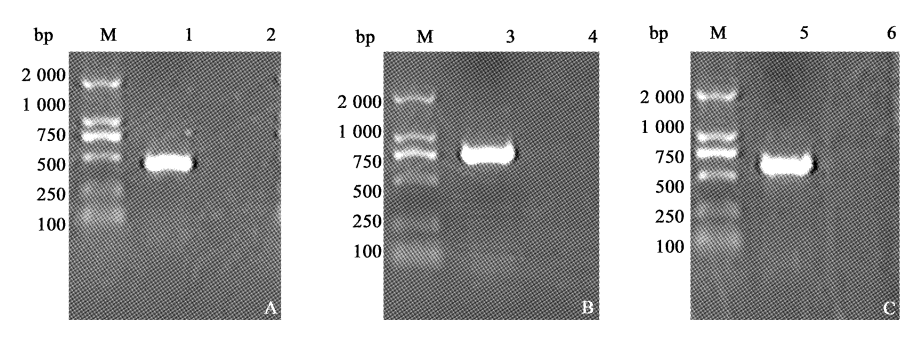



图 1 家蝇 Caspase-1 基因 *Mdom-caspase-1* 的全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Cloning the full-length cDNA of Caspase-1 from *Musca domestica*

A, B, C 分别示中间片段(476 bp)、3′RACE 片段(813 bp)和 5′RACE 片段(658 bp)扩增产物。cDNA fragments (476, 813 and 658 bp, respectively) of *Caspase-1* amplified by PCR, 3′ RACE, 5′RACE are showed in Figs. A, B and C, respectively. M: DNA 标准分子量 DL2000 DNA maker. 1, 3, 6 为扩增片段, 2, 4, 5 为阴性对照。Lanes 1, 2 and 3 show amplification results of PCR, while lanes 2, 4 and 6 show the results of negative control.

从进化树(图 3)可知,家蝇 *Mdom-Caspase-1* 氨基酸序列与黑腹果蝇的 DmelCG, Dmel drICE, DmelD1 和埃及伊蚊的 Aage1、致倦库蚊的 Cqui 等双翅目昆虫 Caspase-1 氨基酸序列相似性可达 77%,与家蚕、棉铃虫、斜纹夜蛾、草地贪夜蛾和粉纹夜蛾等 5 种鳞翅目昆虫的 Caspase-1 氨基酸序列相似性可达 63%,这与家蝇的分类地位相一致。然而家蝇 Mdom-Caspase-1 与同属双翅目昆虫致倦库蚊的 Caspase-3(简称 Cqui3)的序列相似性为 50%,这表明昆虫间不同 Caspase 存在较大的相似性。家蝇与 6 种哺乳动物(褐家鼠 *Rattus norvegicus*、小家鼠 *Mus musculus*、长爪沙鼠 *Meriones unguiculatus*、马 *Equus caballus*、牛 *Bos taurus* 和猪 *Sus scrofa*)的 Caspase-1 相似性只有 18% 左右,这与昆虫与哺乳动物较远的亲缘关系相符。

### 2.3 家蝇 Caspase-1 基因表达的半定量分析

用 GAPDH 为内参基因,调至 PCR 产物表达亮度相同时(图 4: A),根据内参基因模板量确定的家蝇各个虫态 cDNA 模板量,分别对目的基因进行 PCR 异管扩增,27 个循环数,每个 PCR 产物取 8 μL 进行电泳检测,结果如图 4(B)所示。图中不同模板量扩增出的目的基因表达强度代表了 Caspase-1 基因在各虫态的相对表达量,家蝇 Caspase-1 基因在各个虫态中均有表达,但在不同虫态中表达量差异明显,其中在卵期、3 龄幼虫、预蛹、蛹和羽化 5 d 的雌虫中表达量较大,而幼虫 1 龄、2 龄、羽化 1 d 成虫、羽化 3 d 雌、雄虫和羽化 5 d 的雄虫的 Caspase-1 基因表达量均较低。

## 3 讨论

Caspase-1 基因在 Caspase 家族中属于凋亡起始基因(Chowdhury *et al.*, 2008),深入研究其分子特征、表达特性,将为深入研究 Caspase-1 在昆虫生长发育中的作用以及从促进或抑制细胞凋亡角度创制新型昆虫生长发育调节剂提供基础。文献报道认为,Caspase 家族成员间具有高度的保守性,且在所有的多细胞生物中均有发现(Kumar and Cakouros, 2004)。目前已报道的 Caspase 均有 5 个保守的半胱氨酸位点,即 Gln-Ala-Cys-X-Gly(QACXG),在不同的 Caspase 中 X 可为 R、Q 或 G(Bhatia, 2007)。本文通过 RT-PCR 结合 RACE 技术,克隆获得了家蝇 Caspase-1 基因 *Mdom-Caspase-1*,序列特征分析结果表明,*Mdom-Caspase-1* 基因编码的氨基酸同样具有 5 个保守的半胱氨酸位点,即 QACQG(图 2),符合上述特点。但 Caspase 的保守性在不同目、不同科属种间表现出较大的差异性。从进化树(图 3)可知,整个进化树呈现出 4 个大分支,家蝇等双翅目昆虫 Caspase-1 处于同一大分支中,鳞翅目昆虫 Caspase-1 在另一大分支中,致倦库蚊的 Cqui3 单独成为第 3 个分支,6 种哺乳动物 Caspase-1 单独成一分支。结果表明,Caspase 分子进化具有明显的保守性,且 Caspase 的保守性在不同目、不同科属种间表现出较大的差异性,不同生物 Caspase-1 氨基酸序列相似性程度与亲缘关系一致。此外需要注意的是,同类昆虫的不同 Caspase 差异可能很大,如本文分析初步发现,不仅同属双翅目昆虫的家蝇 Caspase-1 与致倦库蚊的 Caspase-3 相似性只有 50%,即使同样是致倦库蚊的 Caspase-1(Cqui)与 Caspase-3(Cqui3)也不在同一分支中。这些结果说明昆虫 Caspase 家族的多样性,也是生物进化的产物。

```
Mdom   -------------------------------------------------MQQGAIAQLA 10
Dmel   MDATNNGESADQVGIRVGNPEQPNDHTDALGSVGSGGAGSSGLVAGSSHPYGSGAIGQLA 60
Aae    ------------------------------------------------------------
Tni    -------------------------------------MLDGESQDNGFVETEQRPNGGGDE 24
Harm   -------------------------------------MLDGDVQDNGSVETEQRPNGGGDE 24
Bmor   -------------------------------------MADEEKKTNG-SGTDQRKNGNEDE 23

Mdom   NKGFGTSSTSN--YTARMPTDRHAVEYNMRHKNRGLAMIFNHEHFTVQSLKSRSGTNVDC 68
Dmel   N-GYSSPSSSYRKNVAKMVTDRHAAEYNMRHKNRGMALIFNHEHFEVPTLKSRAGTNVDC 119
Aae    ------------------------------------------------------------
Tni    GDALGSHESSQSRRYAKMPVDKNAPYYNMNHKYRGMAIIFNHEHFDIHSLKSRTGTNVDS 84
Harm   GDAQGSHDSSHARRFARMPVDRNAPYYNMNHKYRGMAIIFNHEHFDIHSLKSRTGTNVDS 84
Bmor   GDAWGSHGSSQGRRYAKMPVERYAHYYNMNHNNRGMAIIFNHEHFEIHNLKSRTGTNVDS 83

Mdom   DNLARCLKQLDFDVQIYKDSTLKELMRQVEWAASQDHTNNDCILVTILSHGELGYIYAKD 128
Dmel   ENLTRVLKQLDFEVTVYKDCRYKDILRTIEYSASQNHSDSDCILVAILSHGEMGYIYAKD 179
Aae    ---------------------------------MMDHSEHDCVSITILSHGELGYLYAKD 27
Tni    DNLAKVLKGLGFRVTVLTNLKSEEILKYVQQTADMDHSDSDCLLIAVLTHGELGMLYAKD 144
Harm   DNLAKVLKGLGFRVTALNNLKSEEVIRYVQETAEMNHSDFDCLLIAVLTHGELGMLYAKD 144
Bmor   DSLSKVLRGLGFSVTVLHNLRAEDINRYIQQISEMDHTDNDCLLVAVLSHGELGMLYAKD 143
                                          :*:: **: :::*:***:* :****
Mdom   TQYKLDSIWSYFTAQRCPTSAGKPKLFFIQACQGDRLDPGVTMKRAVTQTDGESSMSYKI 188
Dmel   TQYKLDNIWSFFTANHCPSLAGKPKLFFIQACQGDRLDGGVTMQRSQTETDGDSSMSYKI 239
Aae    CQYKLDIIWSYFTANRCPTLAGKPKVFFIQACQGDQLDAGVTLAER-TETDSAGSMSYKI 86
Tni    THYKPENLWYYFTGDKCPTLAGKPKLFFIQACQGDKLDGGVTLSRT--ETDGSPSTSYKI 202
Harm   THYKPENLWYYFTGDKCPTLAGKPKLFFIQACQGDKLDGGITLSRT--ETDGSSSASYKI 202
Bmor   THYKPDNLWYYFTADKCPTLAGKPKLFFIQACQGDKLDGGITLSNT--ETDGSSSSSYRI 201
        :** : :* :**.::**: *****:*********:** *:*: .   :**.  * **:*
Mdom   PVHADFLIAYSTIPGFYSWRNTTRGSWFMQSLCAELTANGKRYDILTLLTFVCQRVAVDF 248
Dmel   PVHADFLIAYSTVPGFYSWRNTTRGTWFMQSLCAELAANGKRLDILTLLTFVCQRVAVDF 299
Aae    PAHADFLIAYSTIPGFYSWRNTQKGSWFMQSLCQELTQHGKKYDLLTLLTFVAQRVAYDF 146
Tni    PVHADFLIVFSTVPGYYSWRNTTRGSWFMQALCEELRYAGTERDILTLLTFVCQRVALDF 262
Harm   PVHADFLIVFSTVPGYYSWRNTTRGSWFMQALCEELRYAGTERDILTLLTFVCQRVALDY 262
Bmor   PIHADFLIVFSTVPGYYSWRNTTRGSWFMQSLCEELRNYGTQRDILTLLTFVCQRVALDF 261
       * ******.:**:**:****** :*:****:** **   *.. *:*******.**** *:
Mdom   ESCTPDTPDMHQQKQIPCITTMLTRILRFSEKNQLPPAARV 289
Dmel   ESCTPDTPEMHQQKQIPCITTMLTRILRFSDK-QLAPAGRV 339
Aae    ESNTPDIPMMHQQKQIPCVTTMLTRLLRFTEK--------- 178
Tni    ESNTPDLMPMHQQKQVPCITSMLTRLLVFGKK--------- 294
Harm   ESNTPDLMPMHQQKQVPCITSMLTRLLVFGRK--------- 294
Bmor   ESNTPDITPMHQQKQVPCINSMLTRLLLFGKK--------- 293
```

图 2　昆虫 Caspase-1 保守氨基酸分析

Fig. 2　Analysis of conserved amino acid of Caspase-1 from insects

Mdom：家蝇 *Musca domestica*（ACF71490）；Aae：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（XP_001655876）；Dmel：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（CAA72937）；Tni：粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*（ACI43910）；Harm：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（ABS18284）；Bmor：家蚕 *Bombyx mori*（NP_001037050）. 阴影区域标注序列为 Caspase-1 的保守区域，星号代表该列氨基酸序列一致；“.”和“：”分别代表具有 1 个或 2 个不一致的氨基酸。氨基酸序列号在括号中标出。The shadow region is the conserved cysteines of Caspase-1, and the asterisks indicate that the amino acid sequence of this line is the same. The symbols “.” and “：” represent one different amino acid or two different amino acids, respectively. GenBank accession numbers of Caspases-1 amino acid sequences are shown in brackets.

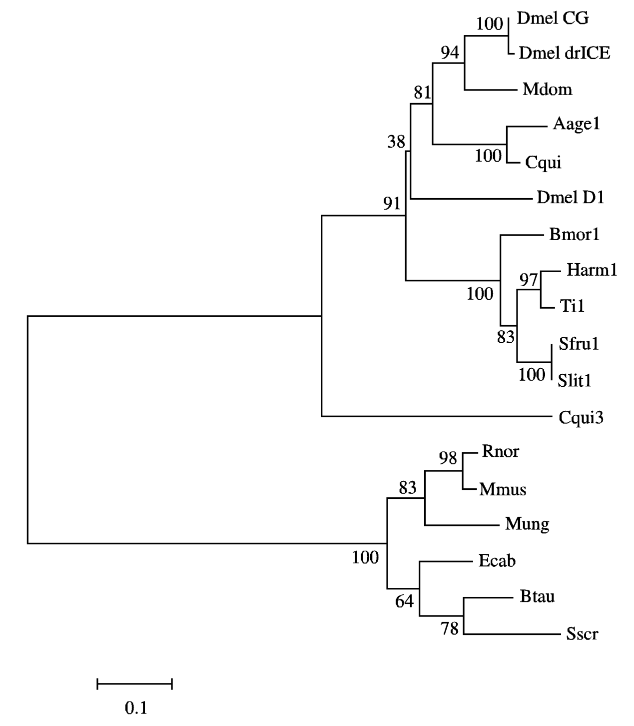



图 3 Caspases 氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequence of Caspases

Mdom：家蝇 *Musca domestica* Caspase-1（ACF71490）；Aage1：埃及伊蚊 *Aedes aegypti* Caspase-1（XP_001655876）；DmelCG, Dmel drICE, DmelD1：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Caspase（AAF56939, CAA72937, NP_476974）；Cqui：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* Caspase-1（XP_001842236）；Harm1：棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Caspasev1（ABS18284）；Bmor1：家蚕 *Bombyx mori* Caspase-1（NP_001037050）；Sfru1：草地贪夜蛾 *Spdoptera frugiperda* Caspase-1（AAC47442）：Slit1：斜纹夜蛾 *Spodoptera littoralis* Caspase-1（AAC47442）：Ti1：粉蚊夜蛾 *Trichoplusia ni* Caspase-1（ACI43910）：Cqui3：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* Caspase-3（XP_001850594）；Rnor：褐家鼠 *Rattus norvegicus* Caspase-1（NP_036894）；Mmus：小家鼠 *Mus musculus* Caspase-1（NP_033937）；Ecab：马 *Equus caballus* Caspase-1（NP_001075311）；Btau：牛 *Bos Taurus* Caspase-1（BAF38372）；Mung：长爪沙鼠 *Meriones unguiculatus* Caspase-1（AAM73653）；Sscr：猪 *Sus scrofa* Caspase-1（NP_999327）。氨基酸序列号在括号中标出。图中数字代表置信区间；标尺代表物种间的遗传距离尺度。GenBank accession numbers of caspases-1 amino acid sequences are shown in brackets. The numbers in the figure indicate the confidence intervals, and the scale stands for genetic distances between different species.

目前已报道的 Caspase 种类较多，已确定至少存在 11 个成员（Callus and Vaux, 2007），而且往往一种生物有多种 Caspase，如哺乳动物 Caspase 种类超过了 15 种（Chowdhury *et al.*, 2008），果蝇基因组中有 7 种编码 Caspase，这可能与不同生物为了适应复杂的发育生存环境有关，但这些 Caspase 往往也有相似的功能，如黑腹果蝇的 DRONC 和人类的 Mch4（即 Caspase-10）都具有长的 N-末端前域，属

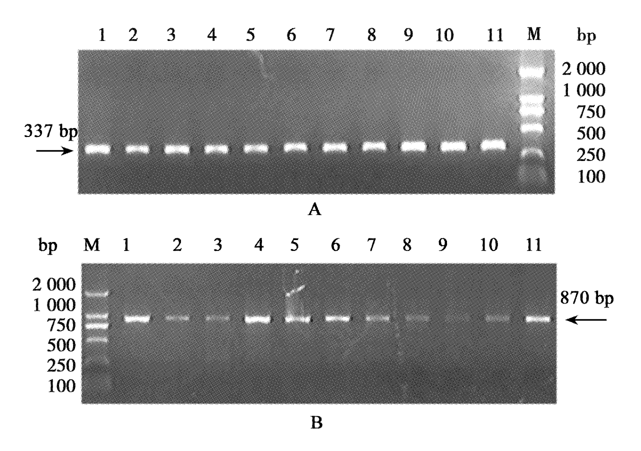



图 4 家蝇 Caspase-1 基因表达的半定量分析

Fig. 4 Semi-quantitative analysis of *Mdom-Caspase-1* gene expression in *Musca domestica*

A：内参基因 GAPAH 在各虫态的表达量 The expression level of GAPAH as an internal marker in different stages；B：*Mdom-Caspase-1* 基因在各虫态的表达量 The expression level of *Mdom-Caspase-1* in different stages. 1 – 11：卵，1 龄幼虫，2 龄幼虫，3 龄幼虫，预蛹，蛹，羽化 1 d 成虫，羽化 3 d 雌、雄虫，羽化 5 d 雄、雌虫 Egg, 1st instar larva, 2nd instar larva, 3rd instar larva, pre-pupa, pupa, 1 d adult, 3 d adult female and male, and 5 d adult male and female, respectively；M：DNA 分子量标准 DL2000 marker.

于起始 Caspases 基因，它们负责传递凋亡信号并激活下游的 Caspases。文献报道认为黑腹果蝇 drICE，草地贪夜蛾 Sf Caspase-1 和家蚕 Caspase-1 等的功能为诱导细胞凋亡（Fraser *et al.*, 1997；Manzoor *et al.*, 1997；Pei *et al.*, 2002）。文献报道亦认为埃及伊蚊、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等昆虫发育与 Caspase-1 基因表达密切相关（Wu *et al.*, 2006；Parthasarathy and Palli, 2007）。本文研究结果表明，家蝇 *Mdom-Caspase-1* 在不同虫态的表达量存在明显差异，在卵后期、3 龄幼虫、预蛹、蛹和羽化 5 d 后的雌虫表达量明显高于其他虫态，这种表达特点符合昆虫发育过程中形态和生理上发生重要变化的需要，如卵即将孵化为幼虫，3 龄幼虫将要化蛹，预蛹向蛹过渡，以及蛹将羽化为成虫，而羽化 5 d 的雌虫也将进入产卵高峰。在这些阶段，昆虫都面临着新旧细胞的更替，需要通过调节 Caspase-1 等细胞凋亡诱导酶的表达，起到加速旧细胞的凋亡以及新细胞的形成。*Mdom-Caspase-1* 基因在家蝇发育变态过程中具体功能尚有待深入研究。

## 参 考 文 献（References）


Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, 1997. *Spodoptera frugiperda* Caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is

the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3): 1 421 – 1 424.

Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T, Pomerenke K, Robertson NM, Dudley K, DuBois GC, Litwack G, 1994. FKBP46, a novel Sf9 insect cell nuclear immunophilin that forms a protein-kinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (49): 30 828 – 30 834.

Bhatia M, Adhikari S, Ramasamy T, Cao Y, 2007. Cell death mechanisms in pancreatitis. In: Pickens CO ed. Cell Apoptotic Signaling Pathways. Nova Science Publishers, Inc., New York. 133 – 162.

Callus BA, Vaux DL, 2007. Caspase inhibitors: Viral, cellular and chemical. *Cell Death and Differentiation*, 14: 73 – 78.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK, 2008. Caspases – An update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 151 (1): 10 – 27.

Cohen GM, 1999. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326: 1 – 16.

Fraser AG, Evan GI, 1997. Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. *The EMBO Journal*, 16: 2 805 – 2 813.

Gupta S, Radha V, Sudhakar Ch, Swaru PG, 2002. A nuclear protein tyrosine phosphatase activates p53 and induces caspase-1-dependent apoptosis. *FEBS Letters*, 532: 61 – 66.

Hebert CG, Valdes JJ, Bentley WE, 2009. Investigating apoptosis: Characterization and analysis of *Trichoplusia ni*-caspase-1 through overexpression and RNAi mediated silencing. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2): 113 – 124.

Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, Acevedo D, Evans-Holm M, Frise E, Wan KH, Park S, Mendez-Lago M, Rossi F, Villasante A, Dimitri P, Karpen GH, Celniker SE, 2007. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science*, 316 (5 831): 1 625 – 1 628.

Kumar S, Cakouros D, 2004. Transcriptional control of the core cell-death machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, 29: 193 – 199.

Kumar S, Doumanis J, 2000. The fly caspases. *Cell Death and Differentiation*, 7: 1 039 – 1 044.

Martinon F, Burns K, Tscho PPJ, 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell*, 10(2): 417 – 426.

Miller DK, Ayala JM, Egger LA, Raju SM, Yamin TT, Ding GJ, Gaffney EP, Howard AD, Palyha OC, Rolando AM, 1993. Purification and characterization of active human interleukin-1 beta-converting enzyme from THP. 1 monocytic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24): 18 062 – 18 069.

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, 316 (5 832): 1 718 – 1 723.

Parthasarathy R, Palli SR, 2007. Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect, *Heliothis virescens*. *Mechanisms of Development*, 124(1): 23 – 34.

Pei Z, Reske G, Huang Q, Hammock BD, Qi Y, Chejanovsky N, 2002. Characterization of the apoptosis suppressor protein P49 from the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus . *Journal of Biological Chemistry*, 277(50): 48 677 – 48 684.

Sambrook J, Ritsch EF, Aniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR, 2006. Mechanisms of midgut remodeling: Juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mechanisms of Development*, 123(7): 530 – 547.

Xu D, Wang Y, Willecke R, Chen Z, Ding T, Bergmann A, 2006. The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 13: 1 697 – 1 706.

Yang DT, Chai LQ, Wang JX, Zhao XF, 2008. Molecular cloning and characterization of Hearm caspase-1 from *Helicoverpa armigera*. *Molecular Biology Reports*, 35 (3): 405 – 412.

（责任编辑:邓艳）